ĆWICZENIE 4

Ilościowe oznaczanie nadtlenku wodoru i ocena potencjału antyoksydacyjnego wybranych przeciwutleniaczy z użyciem rodnika DPPH

1. Ilościowe oznaczanie nadtlenku wodoru

Nadtlenek wodoru (jako utleniacz) reaguje w kwaśnym środowisku z jonami jodkowymi utleniając je do wolnego jodu, który miareczkuje się roztworem tiosiarczanu sodu.

$$H_2O_2 + 2\ KI + H_2SO_4 \rightarrow I_2 + 2\ H_2O + K_2SO_4$$

$$I_2 + 2\ Na_2S_2O_3 \rightarrow 2\ NaI + Na_2S_4O_6$$

Nadtlenek wodoru w reakcji tej redukuje się do wody. Reakcja zachodzi stosunkowo wolno. W celu przyspieszenia reakcji czasami dodaje się do roztworu odpowiedniego katalizatora np. molibdenian amonu. Z reakcji przedstawionych powyżej wynika, że 1 mol nadtlenku wodoru reaguje z 2 molami jonów jodkowych z powstaniem 1 mola jodu. Wydzielony jod reaguje z 2 molami tiosiarczanu sodu. Tak więc na 1 mol nadtlenku wodoru przypadają 2 mole tiosiarczanu sodu.

Wykonanie:

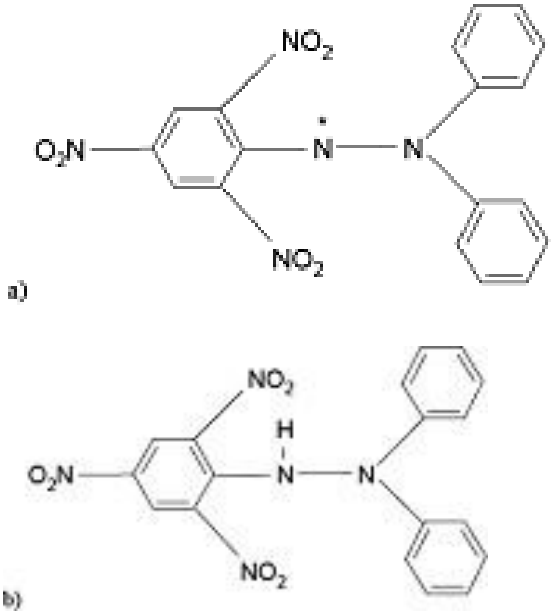
Badany roztwór zawierający H_2O_2 przenieść ilościowo do kolby miarowej na 100 ml i rozcieńczyć wodą destylowaną do kreski. Pobrać do kolby stożkowej 10 ml roztworu, dodać 10 ml 1M H_2SO_4, 10 ml 3% roztworu KI i kryształek molibdenianu amonu. Kolbę szczelnie zamknąć i odstawić na 5 minut w ciemne miejsce. Wydzielony jod miareczkować 0,1 M roztworem tiosiarczanu sodu ($Na_2S_2O_3$) do barwy jasno-żółtej, dodać 5 kropli skrobi i miareczkować dalej, aż roztwór odbarwi się od jednej kropli. Miareczkowanie powtórzyć trzy razy (do obliczeń wykorzystać wartość średnią).

Wykorzystując przedstawioną wyżej zależność - na 1 mol nadtlenku wodoru przypadają 2 mole tiosiarczanu sodu oraz wiedząc że $n_{\text{tiosiarczanu sodu}} = V_{\text{tiosiarczanu}} \cdot C_{\text{tiosiarczanu}}$ obliczyć w gramach zawartość nadtlenku wodoru w badanej próbie (w 100 ml). Masa molowa H_2O_2 = 34 g/mol.

2. Ocena potencjału antyoksydacyjnego wybranych przeciwutleniaczy z użyciem rodnika DPPH

Antyoksydanty są to związki, które w niewielkich stężeniach ochraniają organizm przed działaniem wolnych rodników. Występują m.in. w ziołach, kawie, herbacie, kakao oraz innych produktach pochodzenia roślinnego. Ekstrakty roślinne bogate w polifenole i flawonoidy wykazują silne właściwości antyoksydacyjne, związane z obecnością kilku grup hydroksylowych. Zdolności antyoksydacyjne zależą od położenia i liczby grup hydroksylowych; większa ich ilość nasila właściwości antyoksydacyjne.

Celem ćwiczenia jest zapoznanie z metodyką pomiaru zdolności antyoksydacyjnych wybranych przeciwutleniaczy z użyciem syntetycznego rodnika DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl). DPPH jest stabilnym wolnym rodnikiem i ma niesparowany elektron na powłoce walencyjnej na jednym z atomów azotu tworzących mostek azotowy. Jego alkoholowy roztwór ma ciemnofioletową barwę. W reakcji z substancją, która może oddawać atom wodoru tworzy formę zredukowaną DPPH i wówczas zanika fioletowe zabarwienie roztworu. Zmianę tę można monitorować spektrofotometrycznie. Stopień zmiany barwy roztworu DPPH po dodaniu do niego roztworu zawierającego antyoksydanty jest miarą ich zdolności do zmiatania wolnych rodników.



Rys. 1. DPPH a) wolny rodnik, b) forma zredukowana

Wykonanie:

1. Przygotowanie roztworów antyoksydantów

a) witamina C (4 mM wodny roztwór kwasu askorbinowego) poddana działaniu wolnych rodników (H_2O_2) i temperatury (ogrzewanie w temp. 37°C)

b) witamina E i olej rzepakowy poddany działaniu wysokiej temperatury bez i w obecności witaminy E

Przed pomiarem prowadzono ekstrakcję witaminy E i oleju, polegającą na intensywnym wytrząsaniu próbek oleju i witaminy E w izopropanolu (w stosunku objętościowym 1:3) i rozdzieleniu warstw (do oznaczeń pobierano górną frakcję alkoholową).

c) 0,5% napary herbat: czarna, zielona i biała

1g herbaty zalano 100 ml wody o temperaturze 90^{o}C. Po upływie 8 minut napar sączono i chłodzono do temperatury pokojowej. Napary rozcieńczono wodą w stosunku 1:1.

2. Przygotowanie 0,5 mM alkoholowego roztworu rodnika DPPH

Roztwór przygotowano rozpuszczając 19,71 mg DPPH w 100 ml izopropanolu. Otrzymany roztwór rozcieńczono tak, aby jego absorbancja przy długości fali λ = 517nm wynosiła ok.0,9 (odczytywana wobec izopropanolu).

3. Pomiar absorbancji

Do 2,5 ml roztworu DPPH rozpuszczonego w izopropanolu dodać próbę badaną:

33 µl (roztwór witaminy C i napary),
250 µl (witamina E i olej).

Próby wymieszać i odstawić na 15 minut, a następnie wykonać pomiar absorbancji badanych prób wobec próby kontrolnej (izopropanolu).

4. Obliczenia

Zdolność badanego antyoksydantu do przeciwdziałania reakcji utleniania obliczyć ze wzoru:

$$\% \text{ inhibicji} = 100\ (A_o - A_B) / A_o$$

A_o– wartość absorbancji rodnika DPPH

A_B – wartość absorbancji badanego roztworu zawierającego antyoksydant

5. Wyniki

Badany roztwór	A_B	% inhibicji
Witamina C		
Witamina C po ogrzaniu w temp.37^0C		
Witamina C + 0,3% H_2O_2		
Witamina E		
Olej rzepakowy		
Olej rzepakowy podgrzany do wysokiej temperatury		
Olej rzepakowy podgrzany do wysokiej temperatury + witamina E		
Herbata czarna		
Herbata zielona		
Herbata biała		

Wnioski: porównać właściwości przeciwutleniające witamin i antyoksydantów zawartych w oznaczanych herbatach; ocenić stabilność witaminy C oraz ochronną rolę witaminy E podczas utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych zawartych w olejach.

Zadania

1. Oblicz, jaka jest rozpuszczalność $BaSO_4$ wyrażona w mg/100 ml roztworu. $K_{so} = 1 \cdot 10^{-10}$. (Odp. 0,233 mg/100 ml)
2. Poziom kwasu moczowego we krwi wynosi 0,29 mM; rozpuszczalność tego kwasu we krwi wynosi 7 mg/100ml. Wykonaj odpowiednie obliczenia i odpowiedz czy cały kwas jest rozpuszczony we krwi (m. mol kw. moczowego - 168 g/mol). (Odp. Cały kwas jest rozpuszczony)
3. Ile g stałego chlorku sodu dodasz do 400 g 10% (m/m) roztworu, aby otrzymać roztwór 15% (m/m)? (Odp. 23,53 g)
4. Ile ml 100% kwasu octowego o gęstości d = 1,05 g/ml, użyjesz do sporządzenia 200 g 10% (m/m) roztworu tego kwasu? W jakim stosunku masowym rozcieńczysz 10% m/m ocet, aby otrzymać 6% m/m ocet stołowy? (Odp. v=19,04 ml; 3 : 2)
5. Stężenie chlorku sodowego we krwi wynosi 0,9% (m/v). Oblicz stężenie molowe NaCl we krwi. M(NaCl)=58,5 g/mol. (Odp. 0,15 M)
6. 10 g 30 % (m/m) roztworu nadtlenku wodoru, zwanego perhydrolem, rozcieńczono do objętości 250 ml. Oblicz stężenie molowe otrzymanego roztworu. (Odp. 0,35 M)
7. W przypadku dużego upływu krwi do organizmu wprowadza się płyn fizjologiczny. Oblicz, jakie jest stężenie % (m/m) tego płynu wiedząc, że 250 g tego roztworu zawiera 2,25 g chlorku sodu. Ile gramów soli wprowadza się do organizmu wstrzykując 80 g płynu fizjologicznego? (Odp. 0,72 g)
8. Ile mg bromu zostało wprowadzone do organizmu, jeżeli pacjent otrzymał 5 ml lekarstwa zawierającego 0,2% (m/v) bromku potasu? (m. mol. Br – 80 g/mol, K – 39 g/mol) (Odp. 6,714 mg)
9. Do oznaczania kreatyniny w surowicy krwi stosuje się kwas pikrynowy. Ile g tego kwasu użyjesz do przygotowania 5 l 1% (m/m) roztworu o gęstości d = 1,075 g/ml? (Odp. 53,75 g)
10. U wielu osób stężenie etanolu równe 0,007 g/ml krwi wywołuje objawy zatrucia. Jaka objętość spożytego 40% (v/v) roztworu etanolu (gęstość alkoholu równa jest 0,8 g/ml), wywołuje te objawy, zakładając że cała objętość spożytego alkoholu znajduje się we krwi (5 l)? (Odp. 109,38 ml)
11. Prawidłowe stężenie glukozy w osoczu wynosi 75-105 mg/dl. Pacjentowi z hipoglikemią (poziom glukozy w osoczu = 40 mg/dl) podano z kroplówką 20 ml 5% (m/v) roztworu glukozy. Oblicz, czy ta ilość wystarczy do osiągnięcia prawidłowego stężenia, jeżeli cała glukoza zostanie wchłonięta. Objętość osocza 3 litry. (Odp. Nie)
12. O ile wzrośnie stężenie jonów K^+ w osoczu krwi, jeżeli do kroplówki z glukozą dodano 3 ml 3% (m/v) roztworu KCl? Wyjściowe stężenie jonów K^+ w osoczu wynosi 3,5 mmol/l. Objętość krwi 4 l. Ht = 40%. Podany potas nie wnika do komórek i nie ucieka z moczem. **Hematokryt (Ht) jest to objętość krwinek czerwonych, wyrażona jako funkcja objętości pełnej krwi w próbce**

(wyrażona w procentach). (m. mol KCl – 74,5 g/mol) (Odp. 0,503 mmol/l)

13. Ile ml 10% (m/v) chlorku wapnia $CaCl_2$ należy podać pacjentowi, aby podnieść poziom jonów Ca^{2+} z 2,18 mmol/l do 2,5 mmol/l ? Objętość krwi = 5 l, Ht = 40%. (m. mol $CaCl_2$ – 111 g/mol) (Odp. 1,06 ml)

14. 2 ml 2% (m/v) roztworu leku zmieszano z 2 ml fizjologicznego roztworu NaCl. Pacjent otrzymał 2 ml tak przygotowanego roztworu w iniekcji dożylnej. Ile mg leku otrzymał pacjent? Jakie było stężenie procentowe (m/v) leku w osoczu po podaniu roztworu (V osocza – 3 l)? (Odp. 20 mg; Cp – 0,00067%).

15. W 162 g wody rozpuszczono 63 g związku organicznego. Oblicz ułamek molowy substancji rozpuszczonej i rozpuszczalnika oraz stężenie molalne tej substancji, jeżeli jej masa molowa wynosi 63 g/mol. (Odp. Ułamek molowy substancji rozpuszczonej = 0,1; ułamek molowy rozpuszczalnika = 0,9; stężenie molalne = 6,17 moli/kgH_2O)